



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

(19) SU (11) 1704087 A1

(51) G 01 N 33/53

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4716767/14

(22) 10.07.89

(46) 07.01.92. Бюл. № 1

(71) Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

(72) И. Б. Каргина, О. А. Скрябина и А. В. Хаятова

(53) 615.375(088.8)

(56) Amer. J. Ophthalmol. 1976, v. 81 № 2, p. 129-146.

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ РЕТИНОБЛАСТОМЫ У ДЕТЕЙ

(57) Изобретение относится к онкоофтальмологии и может быть использовано для дифференциальной диагностики ретинобластомы. Целью изобретения является упрощение способа, снижение осложнений и повышение за счет дифференциальной диагностики ретинобластомы от неопухолевой патологии глаза. Цель достигается тем, что включают иммунологическое исследование

больного по реакции гиперчувствительности замедленного типа с помощью водно-солевого экстракта из клеток ретинобластомы. Новым в способе являются постановка теста *in vitro* и определение миграционной способности лейкоцитов периферической крови с использованием водорастворимых антигенных препаратов из биопсийного материала ткани ретинобластомы, содержащих полипептиды с мол.м. 50-100 кД в концентрации 100-200 мкг в мл в интервале 16-22 ч от начала реакции миграции. Способ позволяет повысить точность дооперационной диагностики как поздних, так и ранних стадий развития ретинобластомы у первичных больных, обнаружить развитие опухоли сетчатки другого глаза после удаления худшего глаза по поводу ретинобластомы, снизить травматичность и возможность осложнений.

РТО 2002-5061

S.T.I.C. Translations Branch

Изобретение относится к медицине, а именно к онкоофтальмологии, и может быть использовано для дифференциальной диагностики ретинобластомы от неопухолевых поражений глаза.

Целью изобретения является упрощение способа, снижение осложнений и повышение точности путем дифференциальной диагностики ретинобластомы от неопухолевой патологии глаза.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа проводят *in vitro* и определяют миграционную способность лейкоцитов периферической крови с использованием водорастворимых антиге-

нов с мол.м. 50-100 кД, полученных из биопсийного материала ткани ретинобластомы.

Способ осуществляют следующим образом.

В тесте торможения миграции лейкоцитов определяют миграционную способность лейкоцитов периферической крови в присутствии антигенного препарата из ткани ретинобластомы. Рассчитывают индекс миграции лейкоцитов (ИМ) в процентах. При значениях ИМ ниже 95% ставят диагноз ретинобластома у первичных нелеченых больных. При значениях ИМ равных и выше 95% ставят диагноз неопу-

(19) SU (11) 1704087 A1

BEST AVAILABLE COPY



холевая патология (у первичных нелеченых больных).

Антигенный препарат для диагностики получают следующим способом.

Ткань ретинобластомы, полученную в результате энуклеации и хранящуюся при -20°C , размораживают, взвешивают и гомогенизируют на льду в физиологическом растворе хлористого натрия при pH 4,5–5,0 в весовом соотношении ткань:раствор 1:9. Гомогенат фильтруют через капроновую сетку. Фильтрат охлаждают до $2-3^{\circ}\text{C}$, определяют объем и при pH 4,5–5,0 добавляют хлористый калий, постоянно перемешивая, до конечной его концентрации в фильтрате 3 М. Экстракцию проводят в течение 16 ч при условиях постоянного перемешивания на магнитной мешалке. Материал центрифугируют при 20000 об/мин 30 мин при 4°C .

Из полученного супернатанта на колонке с сефадексом G-75 удаляют хлористый калий и балластные вещества с мол.м. ниже 50000 Д, не обладающие диагностической активностью. На колонку размером $4,0 \times 15$ см наносят 4–5 мл образца, элюцию проводят дистиллированной водой. Фракции свободного объема с мол.м. выше 50000 Д объединяют и лиофилизируют. Препарат используют в тесте миграции лейкоцитов в агаровых блоках в концентрации 100–200 мкг/мл по белку.

Тест торможения миграции лейкоцитов проводят следующим способом. Готовят 3%-ный агар "Дифко" в 0,05 М трис-HCl буферном растворе, содержащем 0,9% NaCl, pH 7,3. Один объем 3%-ного агара при $50-55^{\circ}\text{C}$ смешивают с двумя объемами 199 среды, содержащей 1,5% сыворотки IV группы человека, и заливают в пластиковые чашки до высоты слоя агара 4 мм. После застывания агара чашки ставят в эксикатор с влажной атмосферой и 5%-ным содержанием CO_2 . Эксикатор выдерживают при 4°C не менее 2 ч. В агаровых блоках пробойником диаметром 3 мм вырезают лунки (три для контроля без антигена и по три для проб с антигенами). Агаровые блоки до постановки реакции хранят во влажной камере с 5%-ным содержанием CO_2 при 4°C . Венозную кровь берут в пробирки с 0,5 мл 2,7%-ного раствора трилона В по 4–5 мл от каждого больного. После оседания эритроцитов отбирают плазму, обогащенную лейкоцитами, центрифугируют ее при 1200 об/мин 5 мин. Осадок лейкоцитов дважды отмывают раствором Хенкса, не содержащим ионов кальция и магния, в том же режиме. Доводят концентрацию лейкоцитов до $2,5 \times 10^7$ и вносят суспензию в лунки по 10 мкл. Затем в контрольные лунки

вносят по 10 мкл раствора Хенкса, а в рабочие лунки по 10 мл раствора диагностического антигенного препарата из ткани ретинобластомы, содержащего 100–200 мкг белка в 1 мл раствора Хенкса. Чашки с лейкоцитами в агаровых блоках помещают в эксикатор с влажной атмосферой и 5%-ным содержанием CO_2 . Эксикатор помещают в термостат при 37°C на 17 ч. После инкубации в чашки с агаром заливают 10%-ный раствор формальдегида на 1 ч для фиксирования клеток. Формалин сливают, агар подсушивают до исчезновения влаги в лунках, затем его удаляют. Проводят оценку результатов реакции. Определяют среднюю ширину зон миграции лейкоцитов в контрольных лунках (I_k) и в лунках с антигеном (I_a), как расстояние от границы лунки до края зоны миграции. Рассчитывают индекс миграции лейкоцитов по формуле

$$\text{ИМ} = \frac{I_a}{I_k} \times 100\%$$

Полученные результаты статистически обработаны, подсчитаны средние значения ИМ в следующих группах обследованных детей: группа 1 – первичные больные с ретинобластомой I–IV стадий (8 детей), ИМ = $79 \pm 12\%$, диагноз подтвержден гистологически; группа 2 – больные с рецидивом ретинобластомы на втором глазу после энуклеации худшего глаза, I–II стадии процесса (12 детей), ИМ = $89 \pm 2\%$, диагноз подтвержден гистологически по удаленному худшему глазу; группа 3 – первичные больные до операции с клинически установленным диагнозом ретинобластомы с помощью инструментальных методов и офтальмоскопически, I–II стадии (16 детей), ИМ = $89 \pm 2\%$, у шести детей в дальнейшем была проведена энуклеация и диагноз подтвержден гистологически; группа 4 – контрольная группа детей с неопухоловой патологией глаза с подозрением на ретинобластому, но при положительной динамике диагноз не подтвержден или же не подтвержден гистологически после энуклеации больного глаза (ошибка инструментальной диагностики), среднее значение ИМ = $108 \pm 7,5\%$, состав контрольной группы по заключительному диагнозу следующий: хориоритенит (2 детей), ретинит Коатса (2 детей), катаракта и фиброз стекловидного тела, врожденная патология на глазном дне, последствия перенесенного увеита (8 детей, из них двое с ошибочным диагнозом: ретинобластома не подтвержденным гистологически после удаления глаза); пятая группа – дети с острой формой увеита (7 человек), ИМ = $100 \pm 2,5\%$.

По критерию Уилкоксона-Манна-Уитни значения ИМ - 3 групп отличаются от таковых в 4 и 5 группах с высоким уровнем достоверности. Р ниже 0.001. Один из 36 больных 1-3 групп (2.8%) имел ИМ = 96%, т.е. на уровне верхней границы диагностически значимого показателя. Один из 23-х контрольных детей (4%) имел ИМ = 95% - нижний предел для контрольной группы. У двух из 23-х контрольных детей (ИМ = 100%, ИМ = 105%, 9% больных) произведена энуклеация на основании данных компьютерной томографии, гистологически ретинобластома не подтвердилась.

Пример 1. Больная С.Л., 1980 г. рожд. (обследована в 1982 г.). Диагноз - двухсторонняя ретинобластома I-II стадии. ОД - миопия. В 3-х летнем возрасте у ребенка двухсторонняя ретинобластома, в детстве удалены оба глаза. У матери - врожденная катаракта. В возрасте двух лет у ребенка было замечено свечение зрачка левого глаза (ОС). При поступлении в клинику передний отрезок правого глаза (ОД) не изменен, в нижнем отделе глазного дна от 5 до 7 ч ткань новообразования беловато-сероватого цвета с незначительной проминенцией в стекловидное тело, периферическая граница не офтальмоскопируется. Левый глаз - вся полость глазного яблока заполнена новообразованной тканью. По данным ультразвукового обследования нельзя исключить ретинобластому двухстороннюю. 07.08.82 г. проведено обследование предлагаемым способом в тесте миграции лейкоцитов, с использованием антигенного препарата из ткани ретинобластомы. У больной взято 5 мл венозной крови в пробирку с 0.5 мл 2.7%-ного трилона В, рН 7.3. Кровь отстаивают 40 мин. после оседания эритроцитов отбирают плазму, центрифугируют ее при 1200 об/мин в течение 5 мин. осадок клеток ресуспендируют в растворе Хенкса без кальция и магния рН 7.3. дважды переосаждают в том же режиме центрифугирования. Осадок клеток ресуспендируют в 2 мл раствора Хенкса и с помощью камеры Горяева подсчитывают концентрацию и общее количество выделенных лейкоцитов - 7.5×10^6 . Суспензию центрифугируют в том же режиме, осадок клеток ресуспендируют в 0.3 мл раствора Хенкса для получения концентрации 2.5×10^7 . В лунки заранее приготовленных агаровых блоков с 1%-ным содержанием агара Дифко и 1%-ной сывороткой IV группы крови человека в 19-среде вносят по 10 мл суспензии, т.е. 2.5×10^5 клеток на одну лунку. В три контрольные лунки вносят по 10 мкл раствора

Хенкса, а в три другие лунки той же чашки вносят по 10 мкл раствора антигенного препарата в концентрации по белку 100 мкг/мл (в растворе Хенкса), полученного из ткани ретинобластомы указанным способом. Инкубацию проводят при 37°C во влажной камере с 5%-ным содержанием CO₂ в течение 17 ч. Реакцию останавливают - в каждую чашку диаметром 3.5 см заливают по 2 мл 10%-ного раствора формальдегида и фиксируют в течение 1 ч. Формальдегид сливают, агар подсушивают и удаляют. С помощью бинокулярного микроскопа рассчитывают средние значения ширины зон миграции в контроле и с антигеном. Вычисляют ИМ лейкоцитов: ИМ = 82%, что указывает на угнетение миграционной активности лейкоцитов, отражающее специфическую реакцию Т-лимфоцитов на антигены ретинобластомы. Диагноз: ретинобластома, в дальнейшем подтвержден гистологически после энуклеации худшего глаза. Исследование по предлагаемому способу проведено "слепым" методом. Больная относится к I группе.

Пример 2. Больной Я.О., 1976 г. рожд. Диагноз при поступлении: врожденная патология обоих глаз, микрофтальм, помутнение роговиц, изменения на глазном дне, нистагм: подозрение на ретинобластому: роговица с обширными участками помутнения, единичные синехии, радужка атрофична, хрусталик мутный, стекловидное тело не офтальмоскопируется, рефлекса нет на глазном дне. Данные ультразвукового исследования - единичные плавающие помутнения в стекловидном теле, отслойки сетчатки нет. 20.05.82 г. проведено обследование предлагаемым методом. Все процедуры выполняют, аналогично примеру 1. Определяют ИМ, который равен 114%. Миграционная активность лейкоцитов в ответ на антигенный препарат соответствует норме. В дальнейшем по клинике отрицательной динамики не наблюдалось. Заключительный клинический диагноз: последствия перенесенного внутриутробного увеита. Больной отнесен к контрольной группе - неопухлевая патология сетчатки (IV группа).

Пример 3. Больной Ш.М. На основании исследований методами эхографии и компьютерной томографии поставлен диагноз: односторонняя ретинобластома. 19.11.86 г. Проведено исследование предлагаемым способом, "слепым" методом. Все процедуры выполняют аналогично примеру 1. Определяют ИМ лейкоцитов: ИМ = 100%. На основании клинической инструментальной диагностики была про-

изведена энуклеация глаза с подозрением на ретинобластому. Гистологическое исследование не подтвердило диагноз: ретинобластома, результат совпал с результатом исследования, проведенного предлагаемым способом, исключающим ретинобластому. Заключительный диагноз – последствия перенесенного увеита. Больной отнесен к контрольной группе (IV группа).

Пример 4. Больная Шк. На основании исследований методами эхографии и компьютерной томографии поставлен диагноз ретинобластома. 24.02.88 г. проведено исследование предлагаемым способом "слепым" методом. Все процедуры выполняют аналогично примеру 1. Оценивают результат: ИМ = 115%. На основании результатов инструментальной диагностики больной удален глаз. Результат гистологического анализа совпал с результатом исследования: ретинобластома не подтверждена. Заключительный диагноз – последствия перенесенного увеита. Больная отнесена к контрольной группе (IV группа).

Пример 5. Больная Ш.И., 1986 г. рожд. Диагноз: двухсторонняя ретинобластома I-II стадии. При поступлении ОД (правый глаз) – степень проминенции 4,5 мм, площадь поражения до 50%, OS (левый глаз) – степень проминенции 3,0 мм, площадь поражения 50%. По данным ультразвукового обследования нельзя исключить ретинобластому. 20.04.88 г. проведено обследование предлагаемым методом в тесте миграции лейкоцитов с использованием антигенного препарата из ткани ретинобластома. Все процедуры выполняют аналогично примеру 1, за исключением того, что концентрацию лейкоцитов доводят до $5,0 \times 10^7$ и лейкоциты вносят в дозе $5,0 \times 10^5$ на лунку, а концентрация антигенного препарата ретинобластомы 200 мкг г. мл. ИМ равен 90%. Повторное иммунологическое обследование проведено 12.10.88 г. ИМ 85%. Третье иммунологическое тестирование проведено 23.11.88 г., ИМ 82,5%. Проведено обследование перед операцией: на худшем глазу (ОД) степень проминенции 9,0 мм, площадь поражения 80–90%. Результат иммунологического тестирования: ИМ = 85–89%. Больной Ш. был удален правый глаз. Гистологическое исследование подтвердило диагноз: ретинобластома.

Использование предлагаемого способа позволяет повысить точность дооперационной диагностики ранних (I–II) и поздних (III–IV) стадий развития ретинобластомы у

первичных нелеченых больных, обнаружить развитие опухоли на втором глазу после удаления худшего глаза по поводу ретинобластомы. Способ отличается высокой специфичностью, так как основан на специфической реакции Т-лимфоцитов к антигенам ретинобластомы, специфичность реакции показана в известном способе при использовании кожного теста. Способ не требует дорогостоящей аппаратуры, отличается простотой, высокой воспроизводимостью.

Для оценки специфичности антигенных препаратов, получаемых из ткани ретинобластомы, были обследованы предлагаемым способом дети той же возрастной категории с лимфопролиферативными заболеваниями: злокачественными – лимфогранулематоз, лимфоблейкоз, миелолейкоз, лимфосаркома, а также с доброкачественными лимфопролиферациями – лимфадениты, тонзилит – и практически здоровые дети. В обследованных контрольных группах индивидуальные значения ИМ были в пределах или выше 100% (ошибка оценки ИМ 2–4%). Значения ИМ в контрольных группах, как индивидуальные, так и средние, достоверно отличаются от таковых в группе детей с ретинобластомой (P ниже 0,001) по критерию Уилкоксона-Манна-Уитни. Данные подтверждают высокую специфичность антигенных препаратов ретинобластомы, применяемых для диагностики предлагаемым способом.

Формула изобретения

Способ диагностики ретинобластомы у детей путем клинического исследования и постановки иммунологической реакции на антигенные препараты ретинобластомы, отличающийся тем, что с целью упрощения способа, снижения осложнений и повышения точности путем дифференциальной диагностики ретинобластомы от неопухолевой патологии глаза, в качестве иммунологической реакции проводят у первичных больных определение миграционной способности лейкоцитов периферической крови в присутствии антигенных препаратов в виде водорастворимых полипептидов из опухолевой ткани ретинобластомы с мол.м. 50–100 кД в концентрации 100–200 мкг 1 мл по белку на $2,5 \times 10^5$ лейкоцитов, при этом индекс миграции рассчитывают через 17 ч от начала постановки реакции и при его значениях ниже 95% диагностируют ретинобластому, а при значениях, равном и выше 95% – неопухолевую патологию глаза.